

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 57 423.5

Anmeldetag: 09. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie
(EMBL), Heidelberg, Neckar/DE

Bezeichnung: Mikroskop

IPC: G 02 B 21/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte
European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN** (bis 31.1.01)
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**
DR.-ING. **H. LISK**
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**
DIPL.-PHYS. **B. RUTTENSBERGER**
DIPL.-PHYS. DR.-ING. **V. JORDAN**
DIPL.-CHEM. DR. **M. DEY**
DIPL.-FORSTW. DR. **J. LACHNIT**

Unser Zeichen:
29505P DE/BRfi

Anmelder:
**Europäisches Laboratorium
für Molekularbiologie (EMBL)
Meyerhofstrasse 1**

69117 Heidelberg

Mikroskop

Mikroskop

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Mikroskop gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

10

Im Gegensatz zu der Arbeit an einzelnen Zellen sind lichtmikroskopische Untersuchungen an Embryonen und anderen entwicklungsbiologischen Proben mit den besonderen Problemen der Absorption und des Auflösungsverlustes behaftet. Zum Beispiel können biologische Fragestellungen im Zusammenhang mit Genexpressionsmustern in sich entwickelnden Organismen derzeit nur schwer mit lichtmikroskopischen Bildgebungsverfahren beantwortet werden, da diese oft zu langsam, zu gering auflösend oder technisch komplex sind oder vom freien Arbeitsabstand oder von der Probenhalterung her eine Beobachtung von millimetergroßen Objekten nicht gestatten. Eine akzeptable Lösung muß die Handhabung großer Proben und eine schnelle, hochauflösende Aufnahme der Daten erlauben und dabei

20

Aus der wissenschaftlichen Literatur ist ein Mikroskop für die ozeanographische Forschung bekannt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es mit einem Laser eine Beleuchtungslichtebene in einer Probenkammer erzeugt und senkrecht zu dieser Ebene mit einer Kamera die in der Beleuchtungslichtebene erzeugten Fluoreszenzsignale detektiert [E. Fuchs et al., Opt. Express 10, 145 (2002)]. Dieses Mikroskop ähnelt dem Ultramikroskop von H. Siedentopf und R. Zsigmondy [Ann. Phys. 10(4), 1 (1903)] und wird für die Detektion einzelner freischwimmender Partikel wie Bakterien eingesetzt. Es ist nicht dafür geeignet, millimetergroße, beispielsweise entwicklungsbiologische Proben aufzunehmen, da eine Küvette als Probenhalter dient. Ebenso ist es nicht für dreidimensionale Aufnahmen geeignet, da es über

25

30

keine Möglichkeit verfügt, die Probe relativ zur Beleuchtungslichtebene zu bewegen.

5 Aus der DE 19720513 A1 bzw. der US 5,903,781 sowie aus der wissenschaftlichen Literatur [D. Huber et al., J. Microsc. 202, 208 (2001)] ist ein Instrument für die dreidimensionale Makrographie bekannt, bei dem eine Anordnung zur Erzeugung von Lichtebenen für die photographische Erfassung von Objekten eingesetzt wird. Dabei wird ein Objekt durch eine Beleuchtungsebene bewegt und das reflektierte und gestreute Licht mit
10 einer Kamera detektiert. Dieses Gerät dient dazu, dreidimensionale Rekonstruktionen von zentimetergroßen Objekten anzufertigen. Es ist aber nicht für die Verwendung von Fluoreszenzsignalen und auch nicht für die hochaufgelöste Wiedergabe der Objekte geeignet. Es wird eine Spaltfigurblinde in Verbindung mit einer Spiegelanordnung für die Erzeugung der Lichtebe-
15 nen eingesetzt. Durch den Einsatz eines nur linear beweglichen Proben-
tischs kann die Probe nicht gedreht werden, so dass keine Beobachtung der Probe von mehreren Seiten möglich ist.

20 Ferner sind aus der technisch-wissenschaftlichen Literatur Aufbaue für optische Tomographie bekannt. Die optische Projektionstomographie wird beispielsweise in der Genexpressionsanalyse eingesetzt [J. Sharpe et al., Science 296, 541 (2002)]. Dabei handelt es sich um ein System, in dem Projektionen biologischer Proben aufgezeichnet werden, wobei die Probe um eine Achse senkrecht zur Detektionsrichtung gedreht wird. Da die
25 Probe nicht senkrecht zur Detektionsachse durch eine Beleuchtungslichtebene selektiv beleuchtet wird, hat das Mikroskop im Gegensatz zum erfindungsgemäßen Mikroskop eine sehr große Schärfentiefe, durch den ein großer Teil der Probe erfaßt wird. Daher bietet das Mikroskop nicht die Möglichkeit, die Probe längs der Detektionsachse zu bewegen, um ein
30 dreidimensionales Bild aufzunehmen. Ein dreidimensionales Bild der Probe mit räumlicher Auflösung ist somit nur durch die Rekonstruktion anhand der Projektionen möglich.

Aus der DE 43 26 473 C2 ist ein konfokales Theta-Mikroskop bekannt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es ein erstes Objektiv zur Punktbeleuchtung und ein zweites Objektiv zur Abbildung des Objektlichts auf einen Punktdetektor verwendet, wobei die Detektionsrichtung annähernd senkrecht auf der Beleuchtungsrichtung steht. Dadurch ist der konfokale Überlagerungsbereich des Beleuchtungsvolumens mit dem Detektionsvolumen besonders klein und das Mikroskop erreicht eine fast isotrope Auflösung, deren Größenordnung der lateralen Auflösung eines konfokalen Mikroskops entspricht.

10

Dieses Theta-Mikroskop ist jedoch konfokal arrangiert, was hohe Anforderungen an die relative Justierung des Beleuchtungs- und des Detektionsbrennpunkts stellt. Außerdem ist es trotz eines großen Arbeitsabstands nicht ohne weiteres in der Lage, Aufnahmen von großen Objekten zu machen. Dies liegt daran, dass das Objekt im Theta-Mikroskop bei der Objektrasterung nicht genug Bewegungsfreiheit hat und dass es wegen der Punktdetektion in drei Richtungen gerastert werden muß, wodurch eine Aufnahme sehr lange dauert. Das Beleuchtungslicht wird zu einem Beleuchtungspunkt fokussiert.

20

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, ein Mikroskop vorzuschlagen, das für die hochauflösende dreidimensionale Beobachtung von millimetergroßen biologischen Objekten geeignet ist, wobei eine schnelle Aufnahme der Daten möglich ist und der Aufbau technisch möglichst einfach zu realisieren ist.

25

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das im Anspruch 1 angegebene Mikroskop gelöst. Die Probe wird durch einen dünnen Lichtstreifen beleuchtet und die Beobachtung erfolgt senkrecht zu diesem Objektbeleuchtungsbereich, der eine flächenartige Ausdehnung hat. Die Dicke des Beleuchtungslichtstreifens bestimmt somit zu wesentlichen Teilen die Schärfentiefe des Systems. Für die Bildaufnahme wird das Objekt durch

30

den raumfesten Lichtstreifen bewegt, und Fluoreszenz- oder/und Streulicht werden in jeder Position der Rasterbewegung mit einem flächigen Detektor aufgenommen. Da das Objekt in der bevorzugten Ausführungsform rotiert werden kann, ist es möglich, solche dreidimensionalen Aufnahmen von mehreren Seiten zu machen und sie zu einer einzigen dreidimensionalen Aufnahme zu kombinieren, deren Auflösung nur noch durch die laterale Auflösung der einzelnen Aufnahmen bestimmt wird. Die hohe Auflösung dieser Aufnahme ist das Ergebnis der fokussierten Beleuchtung, der senkrechten Detektion, der Bewegung des Objekts und der Kombination der einzelnen Aufnahmen durch Bildverarbeitung.

Das erfindungsgemäße Mikroskop verfügt über einen Beleuchtungslichtpfad und einen Detektionslichtpfad, die im Objektbeleuchtungsbereich vorzugsweise orthogonal zueinander stehen, wodurch die Detektionsrichtung senkrecht auf der Beleuchtungslichtebene steht. Jedoch werden die Vorteile der Erfindung in ausreichendem Maße auch dann noch erzielt, wenn der Winkel zwischen der Beleuchtungs- und der Detektionsrichtung bzw. zwischen der Beleuchtungslichtebene und der Detektionsrichtung in nicht zu großem Maße von einem rechten Winkel abweicht.

Vorteilhafterweise wird als Lichtquelle ein Laser eingesetzt, der die selektive Anregung von Fluoreszenzemission in der Probe ermöglicht. Zum Fokussieren des Beleuchtungslichts zu einem dünnen Streifen wird vorzugsweise eine Zylinderlinse verwendet, es kann aber auch ein anderes fokussierendes Element (beispielsweise ein holographisches Element oder eine konische Linse (Axicon) oder eine Phasenplatte oder andere Elemente zur Erzeugung eines Bessel-Strahls) eingesetzt werden.

Das detektierte Licht ist vorzugsweise Fluoreszenzlicht. Möglich ist aber auch die Detektion von Streulicht. Das Detektionslicht wird vorzugsweise mit einem telezentrischen System aus zwei Objektiven auf den Detektor abgebildet. Geeignet sind aber auch andere optische Baugruppen.

Die Detektion erfolgt vorzugsweise mit einem flächigen Detektor, der das ganze Feld detektiert, beispielsweise einer CCD-Kamera. Durch die Verwendung eines solchen Detektors ist eine schnelle Bildaufnahme möglich, und die Bewegung der Probe für eine dreidimensionale Aufnahme ist auf eine Richtung (nämlich längs der Detektionsachse) beschränkt. Die Auflösung des Systems wird durch die laterale Auflösung der Detektionsoptik bestimmt.

Da die Fläche der derzeit verfügbaren Detektoren im allgemeinen nicht ausreicht um eine vollständige, hochaufgelöste Aufnahme von mehreren Millimeter großen Objekten zu gewährleisten, besteht in einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops die Möglichkeit, den Detektor in der Detektionsebene, also im Wesentlichen seitlich zur Detektionsrichtung, zu bewegen, um Bilder von Teilen des Objekts aufzunehmen, die zu einem Bild des gesamten Objekts zusammengesetzt werden können.

In einem einfachen, bevorzugten Aufbau werden keine optischen Elemente zur Führung der Strahlengänge verwendet. Es können aber beispielsweise Spiegel, dichroitische Spiegel, Strahlteiler oder optische Fasern für die Führung der Strahlengänge eingesetzt werden. Da in dem erfindungsgemäßen Mikroskop die Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengänge getrennt sind, kann auf den in anderen Fluoreszenzmikroskopen üblichen Einsatz passiver Bauteile wie dichroitischer Spiegel oder aktiver, beispielsweise akusto-optischer Bauteile, für die Trennung von Beleuchtungs- und Fluoreszenzlicht verzichtet werden.

Es besteht die Möglichkeit, den Aufbau zum Beispiel durch einen weiteren Beleuchtungslichtpfad zu ergänzen, dessen Licht zu einem Streifen bzw. Objektbeleuchtungsbereich fokussiert wird, der vorzugsweise in der gleichen Ebene wie der Objektbeleuchtungsbereich des ersten Beleuchtungslichtpfads liegt, so dass eine bessere Ausleuchtung der Probe erreicht wird. Das Licht für diesen weiteren Beleuchtungslichtpfad kann aus derselben

Lichtquelle kommen. Vorteilhafterweise wird die Probe hierbei aus zwei gegenüberliegenden Richtungen beleuchtet. Im Gegensatz zu der 4Pi-konfokalen Mikroskopie [S. Hell und E.H.K. Stelzer, J. Opt. Soc. Am. A 9, 2159 (1992)] ist der Justieraufwand in dem erfindungsgemäßen Mikroskop gering, denn es müssen zwei nur mehrere Mikrometer dicke Lichtstreifen überlagert werden. Außerdem muß die Phase der Strahlen nicht berücksichtigt werden.

Das erfindungsgemäße Mikroskop kann aber auch als nicht-konfokales 4Pi-Theta-Mikroskop betrieben werden. Hierbei wird die Probe wie in einem 4Pi(A)-konfokalen Mikroskop aus zwei entgegengesetzten Richtungen kohärent beleuchtet, so dass längs dieser Beleuchtungsachse ein Interferenzmuster auftritt, das die Intensität in der Beleuchtungslichtebene räumlich moduliert. Dadurch wird das Beleuchtungsvolumen halbiert, und durch ein Verschieben des Interferenzmusters (durch eine Verstellung der Phasendifferenz zwischen den Strahlen) ist es möglich, sich ergänzende Bereiche der Probe zu beleuchten, so dass ein Bild mit erhöhter Auflösung längs der Beleuchtungsachse rekonstruiert werden kann.

Es ist zwar möglich, die Probe in dem erfindungsgemäßen Mikroskop auf einen Probentisch zu legen oder in Luft zu halten, jedoch wird die Probe vorzugsweise durch eine Halterung von oben in einer wassergefüllten Probenkammer gehalten und kann um die senkrechte, also in Schwerkraft-richtung liegende Achse gedreht werden. Dies hat den Vorteil, dass bei der Drehung der Probe für eine Aufnahme aus einer anderen Richtung keine Veränderung der auf die Probe wirkende Schwerkraft erfolgt und sie sich nicht verformt. Vorteilhafterweise wird bei einer solchen Drehung der Probe in der Probenkammer die Probenkammer nicht bewegt, so dass sich die optischen Weglängen (abgesehen von Unterschieden durch den Brechungsindex in der Probe selbst) während des Bewegungsvorgangs nicht ändern. Dies führt zu einer besseren Bildqualität. Vorteilhafterweise kann die auf diese Art gehaltene Probe so ausgerichtet werden, dass der Einfluß von

stark streuenden oder absorbierenden Teilen der Probe bei der Bildaufnahme minimiert wird.

5 Es ist in einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops auch möglich, die Beleuchtungs- und Detektionspfade um das raumfeste zu untersuchende Objekt zu drehen. Dann muß jedoch die Probe bzw. das Objekt im allgemeinen nachgeführt werden, um in weiteren Aufnahmen abgebildet zu werden.

10 Das zu untersuchende Objekt befindet sich bei einer Aufnahme in dem flächenartigen Objektbeleuchtungsbereich, wobei das Objekt wesentlich größer als die Dicke dieses Bereichs ist. Eine zweidimensionale Aufnahme der sich in diesem Bereich befindlichen Teile des Objekts erfolgt durch den flächigen Detektor. Eine dreidimensionale Aufnahme des Objekts erfolgt
15 durch Rasterung des Objekts in Detektionsrichtung durch den raumfesten Beleuchtungsbereich (oder durch Rasterung des Beleuchtungsbereichs durch das Objekt), wobei in jeder Position des Objekts ein zweidimensionales Bild aufgenommen wird. Die Synchronisation von Bewegung, Beleuchtung und Detektion wird vorteilhafterweise optimiert, um die Probenbelastung zu minimieren.
20

Vorzugsweise wird die Drehung des Objekts (ebenso wie die lineare Rasterbewegung) elektronisch gesteuert, so dass die Aufnahme mehrerer Bilder aus verschiedenen Winkeln automatisiert werden kann und die Geschwindigkeit der Probenuntersuchung erhöht wird. Die Anzahl der Bilder und die
25 Drehwinkel der Probe, die für eine Gesamtaufnahme mit einer bestimmten räumlichen Auflösung notwendig sind, können zugunsten einer kurzen Probenuntersuchungszeit und damit einer geringen Probenbelastung optimiert werden.

30

Vorteilhafterweise kann das zu untersuchende Objekt auch um die Beleuchtungsachse gekippt werden, so dass es noch aus zusätzlichen Richtungen

beobachtet werden kann. In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops ist ein zweiter Detektionslichtpfad vorhanden, der die Detektion des nach unten emittierten Lichts erlaubt. Wird dann der Objektbeleuchtungsbereich um 90 Grad um die Beleuchtungsachse gedreht
5 (beispielsweise durch die Drehung der Zylinderlinse), so kann die Probe horizontal optisch geschnitten werden (und durch eine vertikale Rasterbewegung kann eine dreidimensionale Aufnahme erzeugt werden).

Vorteilhafterweise kann in dem erfindungsgemäßen Mikroskop die Zylinderlinse vorzugsweise hochfrequent bewegt werden, beispielsweise im
10 Beleuchtungslichtpfad hochfrequent längs der Zylinderachse und/oder der Beleuchtungsachse bewegt werden oder/und die Zylinderachse hochfrequent in Richtung der Beleuchtungsachse geneigt werden, so dass der Einfluß von Verschmutzungen auf der Zylinderlinse weniger stark ist und
15 die Probe gleichmäßiger ausgeleuchtet wird.

Vorteilhafterweise kann die Halterung vieler biologischer Proben einfach durch Einbetten in ein Gel (ca. 99% Wasser) realisiert werden.

Die durch Drehung des zu untersuchenden Objekts realisierten Aufnahmen aus verschiedenen Richtungen erlauben eine dreidimensionale Rekonstruktion desselben durch die Kombination der einzelnen dreidimensionalen Rohdatensätze. Da bei der bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops nur ein Teil der Probe optimal abgebildet werden (im
20 allgemeinen die beiden Oktanten, die innerhalb des rechten Winkels zwischen Beleuchtungs- und Detektionsachse liegen), sind mindestens vier Aufnahmen für eine gute Rekonstruktion notwendig. Diese Aufnahmen lassen sich so kombinieren, dass die Rekonstruktion eine höhere Auflösung bietet als die einzelnen Aufnahmen. Die Qualität des rekonstruierten Bilds
25 läßt sich durch Aufnahmen entlang weiterer Winkel verbessern, so dass die toten Winkel der gemeinsamen optischen Übertragungsfunktion aufgefüllt werden.
30

Durch die Verwendung von Objektiven mit langen Brennweiten steht ein Arbeitsabstand von mehreren Millimetern zur Verfügung. Die Größe des Objekts wird dadurch in erster Linie durch ihre Lichtdurchlässigkeit begrenzt: Sofern man das Objekt vollständig (und nicht nur die Randschichten) untersuchen will, muß hinreichend Licht aus jedem Teil von ihm in der einen oder anderen Orientierung den Detektor erreichen.

Die Erfindung wird nachstehend anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

10

Fig. 1 die schematische Darstellung des Strahlengangs in einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops, wobei ein einziger Beleuchtungsstrahlengang und ein einziger Detektionsstrahlengang vorhanden sind, betrachtet in Blickrichtung I der Fig. 2;

15

Fig. 2 die in Fig. 1 dargestellte Ausführungsform in Blickrichtung II in Fig. 1;

20

Fig. 3 eine Prinzipdarstellung des Beleuchtungsstrahlengangs, der von einer Zylinderlinse ausgeht und einen Objektbeleuchtungsbereich im Bereich einer Fokuslinie bildet;

25

Fig. 4 eine Draufsicht auf den Strahlengang der Fig. 3 in Blickrichtung IV in Fig. 3;

Fig. 5 die schematische Darstellung des Strahlengangs in einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops, wobei zwei Beleuchtungsstrahlengänge vorhanden sind;

30

Fig. 6 eine weitere Prinzipdarstellung eines erfindungsgemäßen Mikroskops.

Die Fig. 1 zeigt eine Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Mikroskops 100. Der Aufbau umfasst eine Lichtquelle 1, deren kollimierter Lichtstrahl 2 durch eine Zylinderlinse 3 in die Probe 4 fokussiert wird. Dabei entsteht ein dünner vertikaler Lichtstreifen 11, durch den in der Probe 4 Fluoreszenzemission induziert werden kann. Das emittierte Licht 5 wird durch eine Detektionsoptik 6 auf den flächigen Detektor 8, beispielsweise eine CCD-Kamera abgebildet.

Durch die rechtwinklige Anordnung ($= 90$ Grad) von Beleuchtungs- 9 und Detektionsrichtung 10 ist der Aufbau besonders einfach. Insbesondere kann auf den Einsatz dichroitischer Spiegel für die Trennung von Beleuchtungs- und Fluoreszenzlicht im Detektionsstrahlengang 5 verzichtet werden. Die Filter 7 im Beleuchtungs- 2 und im Detektionsstrahlengang 5 sind Glasfilter oder akusto-/elektro-/magneto-optische Filter und erlauben die selektive Auswahl von Wellenlängen für die Beleuchtung und die Detektion.

Die Probe 4 wird durch eine Halterung 12 in einer Probekammer 13 gehalten und für die Bildaufnahme in Detektionsrichtung 10 durch die raumfeste Lichtebe- 11 bewegt. Die Halterung 12 erlaubt außerdem die Drehung der Probe 4 um ihre senkrechte Achse 14, so dass die Probe 4 von mehreren Seiten beleuchtet und beobachtet werden kann.

Die Fig. 3 und 4 zeigen in prinzipieller Art und Weise den vorangehend angesprochenen und unter Einsatz der Zylinderlinse 3 erzeugten Beleuchtungsstrahlengang 2. Durch die Zylinderlinse 3, deren Brennweite vorzugsweise im Bereich zwischen 10 mm und 100 mm liegen kann, wird das von der Lichtquelle 1 emittierte Licht unter einem vergleichsweise kleinen Winkel α fokussiert. Es entsteht im Bereich einer Fokuslinie L somit ein in der Fig. 3 strichliert eingezeichneter Objektbeleuchtungsbereich 20, der näherungsweise eine flächenartige bzw. ebenenartige Struktur bzw. Ausdehnung hat und beiderseits der Fokuslinie durch Zylinderabschnitte gebil-

det ist. Bei einer in Richtung der Beleuchtungsachse bzw. Beleuchtungsrichtung gemessenen Abmessung a dieses Objektbeleuchtungsbereichs 20 von etwa 5 mm und einer Dickenabmessung des Beleuchtungsstrahlengangs 2 im Bereich der Fokuslinie b von etwa $20\ \mu\text{m}$ ergibt sich an den in Beleuchtungsrichtung gelegenen Endbereichen 22, 24 des Objektbeleuchtungsbereichs 20 eine Dickenabmessung c von näherungsweise $60\ \mu\text{m}$, was natürlich abhängt von der für die Zylinderlinse 3 vorgegebene numerische Apertur. Über den gesamten Objektbeleuchtungsbereich 20 hinweg ist also eine - bezogen auf die Abmessung der zu untersuchenden Objekte - vernachlässigbare Variation der Dicke des Objektbeleuchtungsbereichs 20 im Beleuchtungsstrahlengang 2 vorhanden, so dass insbesondere auch unter Berücksichtigung der Abmessungen der zu untersuchenden Objekte hier von einer in erster Näherung konstanten Dicke des Objektbeleuchtungsbereichs und somit einer flächenartigen bzw. ebenenartigen Struktur desselben ausgegangen werden kann.

In der Fig. 5 ist eine abgewandelte Ausgestaltungsform des Mikroskops 100 dargestellt, bei welcher zwei Beleuchtungsstrahlengänge 2, 2' vorhanden sind. Im dargestellten Falle weist jeder dieser beiden Beleuchtungsstrahlengänge 2, 2', die einander entgegengesetzt gerichtete Beleuchtungsrichtungen, jedoch einander entsprechende Beleuchtungsachsen aufweisen, jeweils eine Zylinderlinse 3, 3' mit ggf. zugeordnetem Filter 7, 7' sowie eine Lichtquelle 1, 1' auf. Bei einer Abwandlung dieser Ausgestaltungsform kann weiter vorgesehen sein, dass nur eine einzige Lichtquelle vorgesehen ist. Dabei entsteht durch Überlagerung der beiden Objektbeleuchtungsbereiche dieser Beleuchtungsstrahlengänge 2, 2', welche Objektbeleuchtungsbereiche vorangehend mit Bezug auf die Fig. 3 und 4 detaillierter geschildert worden sind, ein dünner vertikaler Lichtstreifen, der im Vergleich zu dem Lichtstreifen in der in Fig. 1 dargestellten Ausführungsform homogener ist. Das emittierte Licht 5 wird durch eine Detektionsoptik 6 auf den flächigen Detektor 8 abgebildet. Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Mikroskops eignet sich besonders für absorbierende Pro-

ben, bei denen mit einer einseitigen Beleuchtung nicht die gesamte Probe beleuchtet werden kann.

Bei dieser Ausgestaltungsform besteht die Möglichkeit, die beiden Beleuchtungsstrahlengänge 2, 2' bzw. die Lichtstrahlen derselben durch definierte Einstellung der Phasenlage dieser Lichtstrahlen zueinander dort, wo die beiden Objektbeleuchtungsbereiche dieser beiden Beleuchtungsstrahlengänge 2, 2' einander überlagert sind, gezielt zur Interferenz zu bringen. Auf diese Art und Weise wird es möglich, in demjenigen Bereich, in dem das zu untersuchende Objekt bzw. Probe 4 zu beleuchten ist, durch destruktive Interferenz bestimmte Abschnitte auszublenden bzw. durch konstruktive Interferenz bestimmte Bereiche hervorzuheben, wodurch die Auflösung des Gesamtsystems weiter verbessert werden kann.

In Fig. 6 ist eine weitere Abwandlung des erfindungsgemäßen Mikroskops 100 angedeutet. Durch den Pfeil P wird angedeutet, dass die dort gezeigte Zylinderlinse 3 um die Beleuchtungsachse des Beleuchtungsstrahlengangs 2 gedreht werden kann, beispielsweise um 90° . Damit dreht sich auch der Objektbeleuchtungsbereich 20 dieses Beleuchtungsstrahlengangs 2, so dass er ausgehend von der in Fig. 2 gezeigten Orientierung, in welcher er im Wesentlichen in der Zeichenebene liegt, um 90° gedreht ist und dann senkrecht zur Zeichenebene steht. Auf diese Art und Weise wird es möglich, das zu untersuchende Objekt 4 aus einer anderen Richtung zu betrachten, nämlich der in der Darstellung der Fig. 2 unter diesem Objekt 4 liegenden Richtung. Es kann also ein weiterer Detektionsstrahlengang 5' vorgesehen sein, bei welchem dann bezüglich des in der Fig. 1 erkennbaren Detektionsstrahlengangs 5 das zu untersuchende Objekt 4 unter einem Winkel von 90° betrachtet werden kann, ohne dass dieses Objekt 4 selbst gedreht worden wäre.

Bei einem derartigen System ist es beispielsweise möglich, unter Einsatz von Spiegeln 60 und eines Kippspiegels 26 verschiedene Detektionsstrah-

lengänge 5, 5' wahlweise, je nach Stellung des Kippspiegels 26 zu ein und demselben Detektor 8 bzw. ein und demselben optischen System mit Objektiven 6 zu leiten. In Zuordnung zur Drehstellung der Zylinderlinse 3 wird also dann der Kippspiegel 26 entsprechend umgeschaltet. Selbstverständlich ist es möglich, zwei Detektionsstrahlengänge 5, 5' mit jeweils zugeordneter Objektivanordnung und Detektor voneinander unabhängig und beispielsweise unter einem Winkel von 90° vorzusehen. Weiter ist es möglich, zumindest eines dieser Systeme dann bewegbar zu gestalten, so dass es zusammen mit der Zylinderlinse 3 um die Beleuchtungsachse des Beleuchtungsstrahlengangs 2 in Fig. 2 gedreht werden kann, so dass bei gleichzeitiger Drehung der Zylinderlinse 3 und dieses Detektionsstrahlengangs dann eine Rundumaufnahme des zu untersuchenden Objekts 4 erzeugt werden kann, ohne dass dieses Objekt selbst bewegt worden wäre.

Die Erfindung betrifft ein Mikroskop, bei dem eine Schicht der Probe durch einen dünnen Lichtstreifen 11 beleuchtet wird und die Beobachtung senkrecht zu der Ebene des Lichtstreifens erfolgt. Die Dicke des Lichtstreifens 11 bestimmt somit wesentlich die Schärfentiefe des Systems. Für die Bildaufnahme wird das Objekt 4 durch den bezüglich des Detektors feststehenden Lichtstreifen 11 bewegt, und Fluoreszenz- oder/und Streulicht wird mit einem flächigen Detektor aufgenommen. Stark absorbierende oder stark streuende Objekte 4 werden aus mehreren Raumrichtungen beobachtet. Die dreidimensionalen Aufnahmen, die aus jeder Richtung gemacht werden, können nachträglich zu einer Aufnahme kombiniert werden, in der die Daten entsprechend ihrer Auflösung gewichtet werden. Die Auflösung der kombinierten Aufnahme wird dann durch die laterale Auflösung der einzelnen Aufnahmen dominiert.

Ansprüche

- 5 1. Mikroskop mit wenigstens einem Beleuchtungsstrahlengang (2; 2, 2') und wenigstens einem Detektionsstrahlengang (5),
dadurch gekennzeichnet,
- dass bei jedem Beleuchtungsstrahlengang (2; 2, 2') eine Fokussieranordnung (3; 3, 3') vorgesehen ist zur Erzeugung eines in Richtung einer Beleuchtungsachse des Beleuchtungsstrahlengangs (2; 2, 2') und quer dazu ausgedehnten flächenartigen Objektbeleuchtungsbereichs (20),
 - dass eine Detektionsrichtung (10) des wenigstens einen Detektionsstrahlengangs (5) näherungsweise orthogonal zu dem flächenartigen Objektbeleuchtungsbereich (20) steht, und
 - 15 - dass eine Bewegungsanordnung (12) vorgesehen ist zur Erzeugung einer Relativbewegung zwischen dem flächenartigen Objektbeleuchtungsbereich (20) und einem zu untersuchenden Objekt (4).
- 20 2. Mikroskop nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass durch die Bewegungsanordnung (12) eine Drehbewegung des Objekts (4) oder/und eine Verschiebewegung des Objekts (4) erzeugbar ist.
- 25 3. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bewegungsanordnung (12) dazu ausgebildet ist, bei im Wesentlichen feststehendem flächenartigen Objektbeleuchtungsbereich (20) das Objekt (4) zu bewegen.
- 30 4. Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet, dass die Bewegungsanordnung dazu ausgebildet ist, bei im Wesentlichen feststehendem Objekt (4) den flächenartigen Objektbeleuchtungsbereich (20) zu bewegen.

- 5 5. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass der wenigstens eine Beleuchtungs-
strahlungsgang (2; 2, 2') eine Zylinderlinse (3; 3, 3) zum Fokussieren des Beleuchtungslichts aufweist.
- 10 6. Mikroskop nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet, dass die Zylinderlinse (3; 3, 3') um die
Beleuchtungsachse drehbar ist oder/und in Richtung der Beleuch-
tungs- oder/und der Zylinderachse verschiebbar ist oder/und mit der
Zylinderachse bezüglich der Beleuchtungsachse kippbar ist.
- 15 7. Mikroskop nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, dass die Bewegung der Zylinderlinse (3; 3,
3') eine hochfrequente Bewegung ist.
- 20 8. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, dass Streulicht oder Fluoreszenzlicht einer
oder mehrerer Wellenlängen verwendet wird.
- 25 9. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquelle (1; 1, 1') eine Lampe
oder ein Laser ist, die Licht einer oder mehrerer Wellenlängen zur
Verfügung stellen.
- 30 10. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, dass das Objekt (4) durch eine Halterung
(12) in einer Probenkammer (13) zu halten ist und darin um eine im

Wesentlichen einer Schwerkraftrichtung entsprechende Achse (14) drehbar und entlang mindestens einer Richtung bewegbar ist.

- 5 11. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens zwei Beleuchtungsstrahlengänge (2, 2') mit im Wesentlichen entgegengesetzter Beleuchtungsrichtung vorgesehen sind zur Erzeugung sich wenigstens bereichsweise überlappender flächenartiger Objektbeleuchtungsbereiche (20).
- 10 12. Mikroskop nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht der beiden Beleuchtungsstrahlengänge (2, 2') in Richtung der Beleuchtungsachse im Bereich des flächenartigen Objektbeleuchtungsbereichs (20) wenigstens bereichsweise interferiert.
- 15 13. Mikroskop nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht der beiden Beleuchtungsstrahlengänge (2, 2') eine konstante, einstellbare Phase aufweist.
- 20 14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet, dass der wenigstens eine Detektionsstrahlengang (5) einen Detektor aufweist und dass der Detektor seitlich bezüglich der Detektionsrichtung des wenigstens einen Detektionsstrahlengangs (5) bewegbar ist.
- 25 15. Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet, dass der wenigstens eine Detektionsstrahlengang (5; 5') derart anpassbar ist, dass die Detektionsrichtung bei Verlagerung des Objektbeleuchtungsbereichs (20) näherungsweise
- 30

- 17 -

orthogonal zu dem flächenartigen Objektbeleuchtungsbereich (20) liegt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mikroskop, bei dem eine Schicht der Probe durch
5 einen dünnen Lichtstreifen (11) beleuchtet wird und die Beobachtung
senkrecht zu der Ebene des Lichtstreifens erfolgt. Die Dicke des Lichtstreifens (11) bestimmt somit wesentlich die Schärfentiefe des Systems. Für
die Bildaufnahme wird das Objekt (4) durch den bezüglich des Detektors
feststehenden Lichtstreifen (11) bewegt, und Fluoreszenz- oder/und Streu-
10 licht wird mit einem flächigen Detektor aufgenommen. Stark absorbierende
oder stark streuende Objekte (4) werden aus mehreren Raumrichtungen
beobachtet. Die dreidimensionalen Aufnahmen, die aus jeder Richtung
gemacht werden, können nachträglich zu einer Aufnahme kombiniert
werden, in der die Daten entsprechend ihrer Auflösung gewichtet werden.
15 Die Auflösung der kombinierten Aufnahme wird dann durch die laterale
Auflösung der einzelnen Aufnahmen dominiert.

(Fig. 1)

ba 09.12.2002

Fig. 1

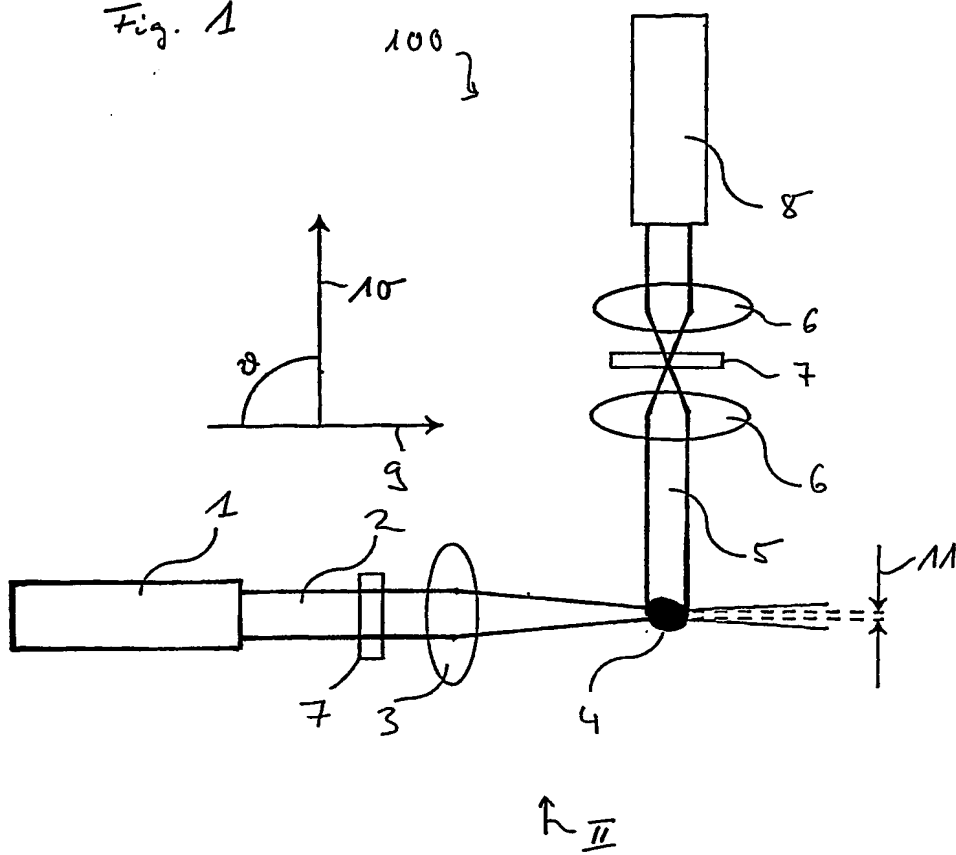


Fig. 1

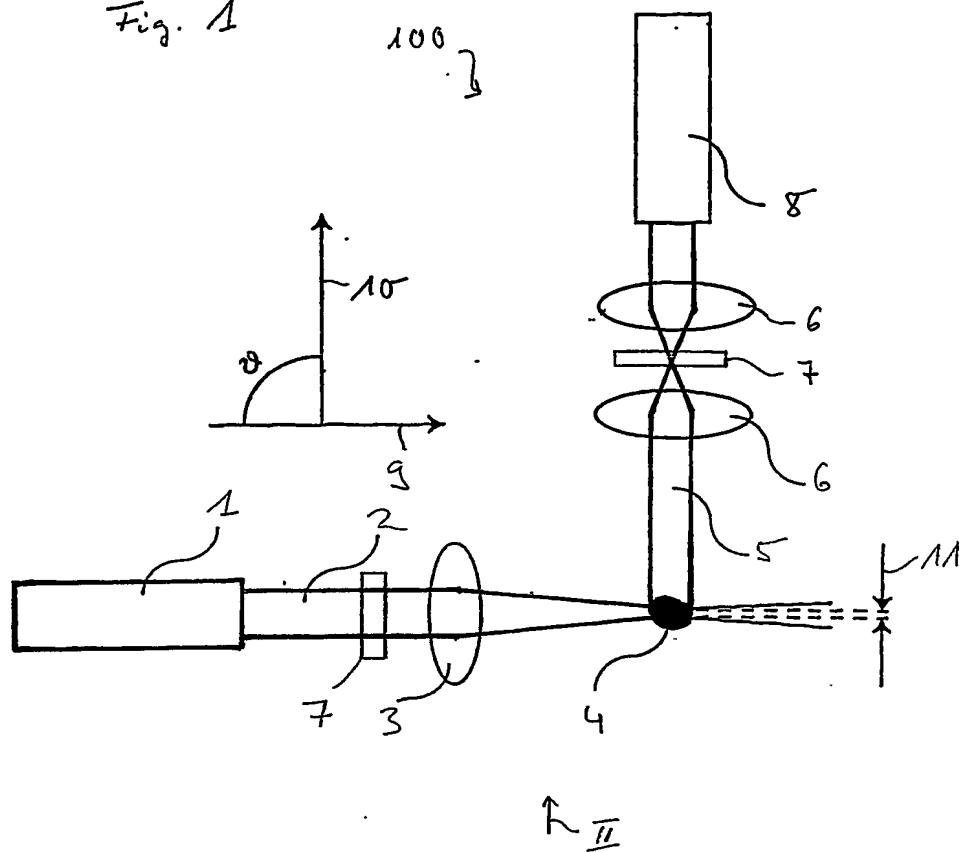
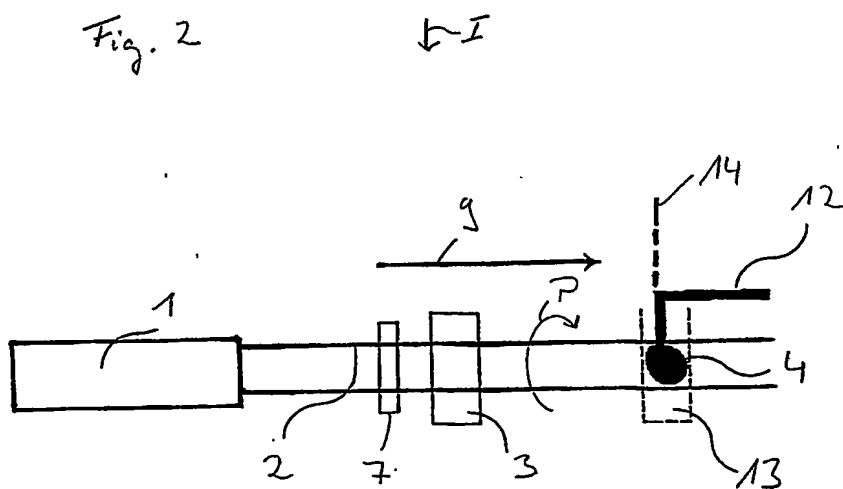
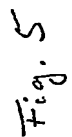


Fig. 2





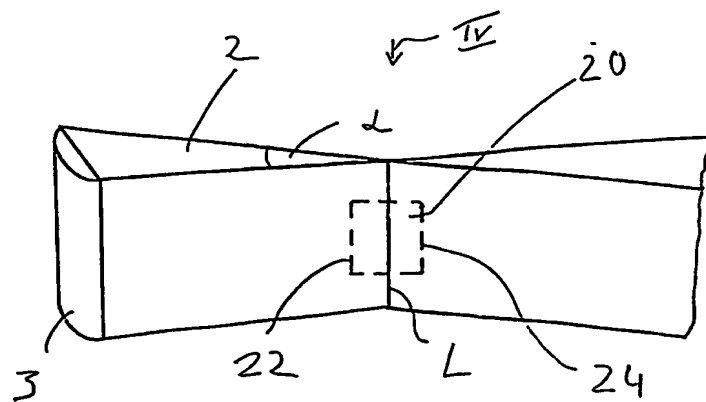


Fig. 3

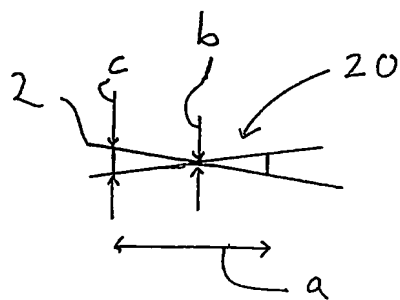


Fig. 4

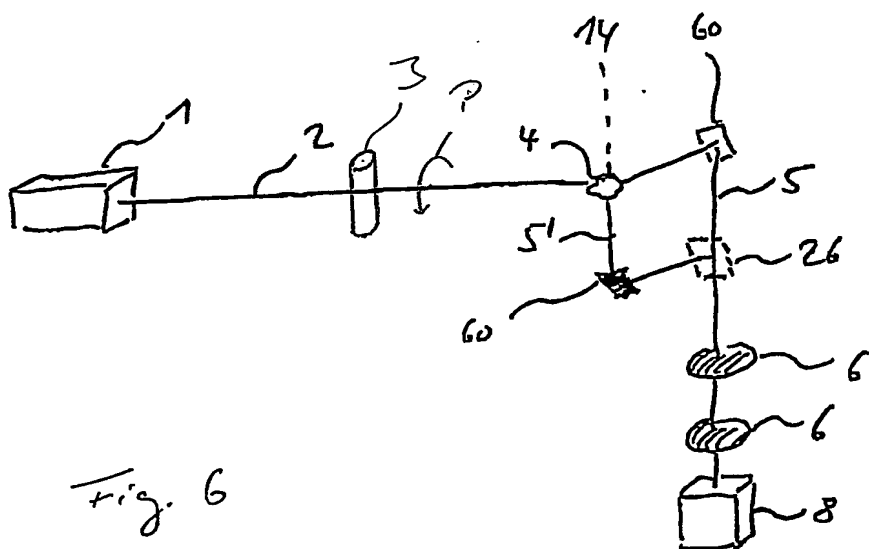


Fig. 6